



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

| | | | |
|--|--|--|---|
| (51) Classification internationale des brevets ⁷ : C12Q 1/68, G01N 33/543 | | A1 | (11) Numéro de publication internationale: WO 00/36145 |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/03141 | | (43) Date de publication internationale: 22 juin 2000 (22.06.00) | |
| (22) Date de dépôt international: 15 décembre 1999 (15.12.99) | | (81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). | |
| (30) Données relatives à la priorité: 98/15883 16 décembre 1998 (16.12.98) FR | | Publiée Avec rapport de recherche internationale. | |
| (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33, rue de la Fédération, F-75752 Paris 15ème (FR). | | | |
| (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ROSILIO, Charles [FR/FR]; 16, allée de la Pommeraie, F-91190 Gif-sur-Yvette (FR). CAILLAT, Patrice [FR/FR]; 10, rue de Provence, F-38130 Echirolles (FR). | | | |
| (74) Mandataire: DES TERMES, Monique; BREVATOME, 3, rue du Docteur Lancereaux, F-75008 Paris (FR). | | | |

(54) Title: METHOD FOR MAKING A BIOCHIP AND BIOCHIP

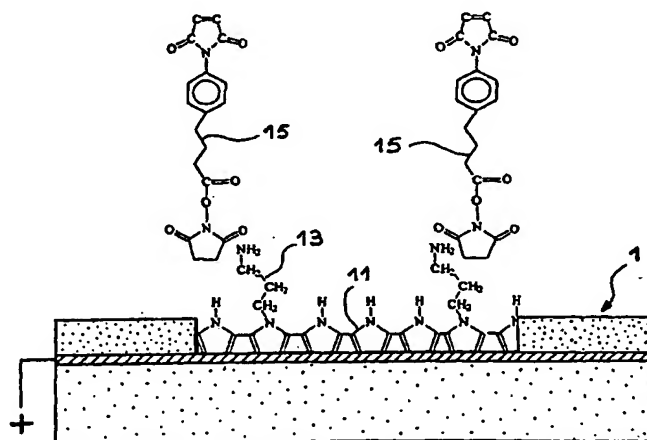
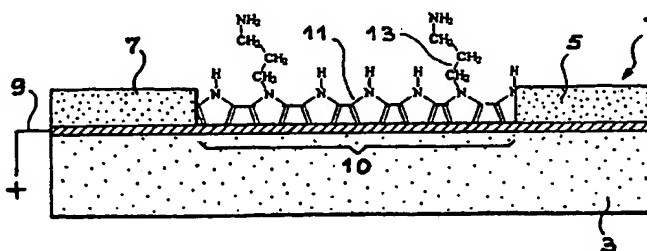
(54) Titre: PROCEDE DE FABRICATION D'UNE BIOPUCE ET BIOPUCE

(57) Abstract

The invention concerns a method for making a biochip and a biochip, said biochip consisting in particular of biological probes grafted on an conductive polymer. The inventive method comprises the following steps: a) structuring a substrate so as to obtain on said substrate microwells comprising at their base a layer of a material capable of initiating and promoting adhesion thereon of a copolymer film of pyrrole and pyrrole functionalised by electropolymerisation; b) collective electropolymerisation so as to form an electropolymerised film of a copolymer of pyrrole or functionalised pyrrole on the base of said microwells; c) directly or indirectly fixing functionalised oligonucleotides by micro-deposition or liquid jet printing process.

(57) Abrégé

La présente invention se rapporte à un procédé de fabrication d'une biopuce et à une biopuce, ladite biopuce étant constituée notamment de sondes biologiques greffées sur un polymère conducteur. Le procédé de l'invention comprend les étapes suivantes : a) structuration d'un substrat de manière à obtenir sur ce substrat des microcuvettes comprenant dans leur fond une couche d'un matériau capable d'initier et de promouvoir l'adhésion sur celle-ci d'un film d'un copolymère de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé par électropolymérisation; b) électropolymérisation collective, de manière à former un film électropolymérisé d'un copolymère de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé sur le fond desdites microcuvettes, c) fixation directe ou indirecte d'oligonucléotides fonctionnalisés par microdépôt ou technique d'impression par jets de liquide.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | | | |
|----|---------------------------|----|---|----|--|----|-----------------------|
| AL | Albanie | ES | Espagne | LS | Lesotho | SI | Slovénie |
| AM | Arménie | FI | Finlande | LT | Lituanie | SK | Slovaquie |
| AT | Autriche | FR | France | LU | Luxembourg | SN | Sénégal |
| AU | Australie | GA | Gabon | LV | Lettonie | SZ | Swaziland |
| AZ | Azerbaïdjan | GB | Royaume-Uni | MC | Monaco | TD | Tchad |
| BA | Bosnie-Herzégovine | GE | Géorgie | MD | République de Moldova | TG | Togo |
| BB | Barbade | GH | Ghana | MG | Madagascar | TJ | Tadjikistan |
| BE | Belgique | GN | Guinée | MK | Ex-République yougoslave de Macédoine | TM | Turkménistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Grèce | ML | Mali | TR | Turquie |
| BG | Bulgarie | HU | Hongrie | MN | Mongolie | TT | Trinité-et-Tobago |
| BJ | Bénin | IE | Irlande | MR | Mauritanie | UA | Ukraine |
| BR | Brésil | IL | Israël | MW | Malawi | UG | Ouganda |
| BY | Bélarus | IS | Islande | MX | Mexique | US | Etats-Unis d'Amérique |
| CA | Canada | IT | Italie | NE | Niger | UZ | Ouzbékistan |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon | NL | Pays-Bas | VN | Viet Nam |
| CG | Congo | KE | Kenya | NO | Norvège | YU | Yougoslavie |
| CH | Suisse | KG | Kirghizistan | NZ | Nouvelle-Zélande | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | République populaire démocratique de Corée | PL | Pologne | | |
| CM | Cameroun | KR | République de Corée | PT | Portugal | | |
| CN | Chine | KZ | Kazakhstan | RO | Roumanie | | |
| CU | Cuba | LC | Sainte-Lucie | RU | Fédération de Russie | | |
| CZ | République tchèque | LI | Liechtenstein | SD | Soudan | | |
| DE | Allemagne | LK | Sri Lanka | SE | Suède | | |
| DK | Danemark | LR | Libéria | SG | Singapour | | |
| EE | Estonie | | | | | | |

PROCÉDE DE FABRICATION D'UNE BIOPUCE ET BIOPUCE

Domaine technique de l'invention

La présente invention se rapporte à un procédé
5 de fabrication d'une biopuce et à une biopuce, ladite
biopuce étant constituée notamment de sondes
biologiques greffées sur un polymère conducteur.

Les dispositifs d'analyse biologique, par
exemple de type puce à ADN, constituent des outils
10 performants pour l'analyse en parallèle d'un grand
nombre de gènes ou de séquences d'ADN ou d'ARN. Leur
principe de fonctionnement repose sur la propriété
d'hybridation ou d'appariement de deux brins de
séquences complémentaires afin de reconstituer la
15 double hélice d'ADN. Pour ce faire, des sondes
d'oligonucléotides de séquence connue, immobilisées sur
un substrat support, sont mises en présence de cibles
extraites d'un échantillon biologique à analyser, et
marquées à l'aide de marqueurs fluorescents.

20 L'hybridation est ensuite repérée et la
séquence détectée par analyse de la surface de la puce
par un marqueur approprié par exemple permettant de
détecter la séquence par fluorescence.

Des technologies très différentes ont été
25 utilisées pour la réalisation de ces matrices de
sondes. Diverses techniques d'immobilisation ou de
greffage des sondes sur des substrats différents ont
fait l'objet d'études et de développements industriels
importants.

30

Etat de l'art antérieure

Il existe principalement trois méthodes
d'adressage de sondes chimiques qui constituent des

approches différentes de réalisation et d'utilisation de sondes pour différents domaines d'application. Il s'agit de l'adressage photochimique, de l'adressage mécanique, par exemple par micropipetage à l'aide d'un robot disperseur, et de l'adressage électrochimique.

Par exemple, l'adressage électrochimique peut être utilisé pour les sondes d'oligonucléotides. Pour ce faire, des matrices d'électrodes adressées individuellement sont réalisées sur un substrat de verre.

Le principe d'immobilisation des sondes biologiques repose sur un dépôt par électropolymérisation d'un copolymère de pyrrole et de pyrrole substitué par un oligonucléotide (Py-ODN), portant un oligonucléotide greffé sur un noyau de pyrrole soit directement, soit indirectement par l'intermédiaire d'un espaceur.

Dans le but de développer des systèmes d'analyse biologique massivement parallèles, à grande capacité ou densité de sites actifs, il est nécessaire de pouvoir adresser individuellement un nombre important de sondes.

Les procédés utilisant un adressage électrochimique nécessitent à la fois une matrice importante d'électrodes et de connexions et un multiplexeur pour indexer électriquement chacun des sites de la puce. De plus, dans ces procédés, il faut réaliser l'électropolymérisation par trempage de la puce entière successivement dans des solutions de chacun des Py-ODN contenus dans la cellule. Ces procédés sont donc limités à des puces de faible densité, c'est-à-dire d'environ une centaine de sondes, pour des applications limitées et spécifiques.

D'autres procédés ont encore été décrits dans l'art antérieur remplaçant avantageusement l'adressage électrique individuel par un adressage mécanique. Il reste cependant un inconvénient, celui de réaliser des électropolymérisations dans des microcuvettes, avec un volume de solution de l'ordre du nanolitre, pour lequel il est nécessaire de retarder l'évaporation après micropipetage de l'ensemble des sondes sur la plaquette afin que l'électropolymérisation puisse se faire.

10

Exposé de l'invention

La présente invention a précisément pour but de résoudre les problèmes précités en fournissant un procédé de fabrication d'une biopuce constituée notamment de sondes biologiques greffées sur un polymère conducteur, ledit procédé présentant notamment l'avantage de ne nécessiter l'utilisation que d'une seule solution d'un mélange en proportion adéquate de pyrrole et de pyrrole substitué (Py et Py-R-F ou F et une fonction chimique réactive et R est un groupement espaceur aliphatique ou aromatique) pour une seule électrodéposition collective sur l'ensemble des microcuvettes.

Le procédé de l'invention se caractérise en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) structuration d'un substrat de manière à obtenir sur ce substrat des microcuvettes comprenant dans leur fond une couche d'un matériau capable d'initier et de promouvoir l'adhésion sur celle-ci d'un film d'un copolymère de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé par électropolymérisation,
- b) électropolymérisation collective, de manière à former un film électropolymérisé d'un copolymère de

pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé sur le fond
desdites microcuvettes, sur la couche dudit
matériau, à partir d'une solution de pyrrole et de
pyrrole fonctionnalisé, en présence de réactifs
5 chimiques appropriés pour ladite
électropolymérisation,

c) fixation directe, ou indirecte, d'une sonde
biologique sur le pyrrole fonctionnalisé, par
injection d'une solution de la sonde biologique, au
10 choix dans une ou plusieurs microcuvette(s) en
présence de réactifs chimiques nécessaires à la
fixation directe, ou indirecte, de cette sonde
biologique sur le pyrrole fonctionnalisé.

Selon l'invention, la couche du matériau
15 capable d'initier et de promouvoir l'adhésion du film
de copolymère de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé
par électropolymérisation sur celle-ci peut être une
couche métallique, l'étape a) précitée pouvant alors
comprendre une étape de dépôt de ladite couche
20 métallique sur le substrat, et une étape de dépôt d'une
couche de résine ou de polymère sur la couche
métallique et de développement ou de gravure de ladite
couche de manière à former les microcuvettes dont le
fond est constitué au moins en partie de la couche
25 métallique.

Selon l'invention, la couche métallique peut
être par exemple une couche d'or, une couche de cuivre
ou d'argent ou d'aluminium.

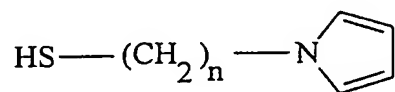
Selon l'invention, le substrat peut être par
30 exemple une plaquette de silicium, une plaquette de
verre ou un support plastique flexible si nécessaire.

Selon un autre mode de réalisation de la
présente invention, l'étape a) peut comprendre en outre

une étape de traitement de la couche d'or au fond des microcuvettes en présence d'un pyrrole fonctionnalisé par exemple avec un groupement thiol de manière à former une monocouche de pyrrole sur ladite couche
5 métallique, par exemple sur ladite couche d'or, au fond desdites microcuvettes. Cette monocouche est capable d'initier et de promouvoir l'adhésion d'un film de polypyrrole par électropolymérisation. comme l'ont montré R. Simon et coll. (J. Am. Chem. Soc., 1982, 104,
10 2031). Il s'agit d'une monocouche auto-assemblée (SAM) d'un pyrrole fonctionnalisé pour son accrochage sur le fond des microcuvettes.

Selon l'invention, le pyrrole fonctionnalisé peut être un pyrrole qui présente un groupement
15 chimique permettant sa fixation par liaison covalente avec la couche métallique, et/ou avec la sonde biologique. Dans le cas de sa fixation à la couche métallique, par exemple à la couche d'or, un pyrrole fonctionnalisé avec un groupement thiol ou disulfure
20 peut également être utilisé.

Par exemple, le pyrrole fonctionnalisé avec un groupement thiol peut avoir la formule chimique suivante :



25 dans laquelle n peut avoir une valeur allant de 1 à 10, par exemple n peut être égal à 6.

Pour une électrode métallique en aluminium, on peut choisir un pyrrole fonctionnalisé avec un groupe -COOH.

30

Selon un autre mode de réalisation de la présente invention, le substrat peut être une plaquette de silicium et la couche capable d'initier et de promouvoir l'adhésion sur celle-ci d'un film de polypyrrole par électropolymérisation, peut être une couche de silane présentant un alignement de sites pyrroles. L'étape a) du procédé de la présente invention peut alors comprendre une étape de dépôt d'une couche de résine sur la plaquette de silicium, ladite plaquette de silicium étant recouverte d'un film de SiO_2 , et de gravure de ladite couche de résine de manière à former les microcuvettes dont le fond est constitué au moins en partie du film de SiO_2 ; et une étape de traitement des microcuvettes au moyen d'un agent de silanisation fonctionnalisé avec un pyrrole de manière à fixer, sur le film de SiO_2 , dans le fond des microcuvettes la couche de silane présentant un alignement de sites pyrroles.

Selon l'invention, l'agent de silanisation peut être choisi dans un groupe comprenant le N-(3-(triméthoxy silyl)propyl) pyrrole, ou tout autre pyrrole fonctionnalisé avec un groupement $-\text{SiCl}_3$ ou $-\text{Si}(\text{OMe})_3$. Le film de SiO_2 peut être un film naturel de SiO_2 présent sur les plaquettes de silicium.

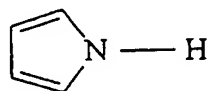
Selon l'invention, quel que soit le mode de réalisation, la résine peut être une résine photosensible, dont le masquage, l'insolation et le développement permettent de former les microcuvettes.

Selon l'invention, l'électropolymérisation collective de l'étape b) du procédé peut être par exemple réalisée par trempage du substrat structuré obtenu à l'étape a) précitée dans un bain

électrolytique comprenant une solution de pyrrole, de pyrrole fonctionnalisé, et de réactifs chimiques appropriés pour l'électropolymérisation, en présence d'une contre-électrode à l'électrode de travail qui
5 trempe dans le bain électrolytique et est indépendante du substrat structuré.

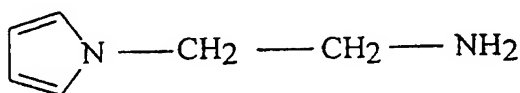
Selon l'invention, dans cette étape b), le pyrrole fonctionnalisé peut être un pyrrole comportant un groupement choisi dans un ensemble comprenant un
10 groupement NH_2 , un groupement thiol, un groupement ester succinimide, un groupement triméthoxy silyl, un groupement carboxylique, aldéhyde et isothiocyanate.

Selon l'invention, le pyrrole fonctionnalisé par l'électropolymérisation peut par exemple être
15 choisi parmi un des composés suivants :



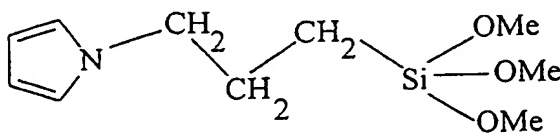
PYRROLE

20

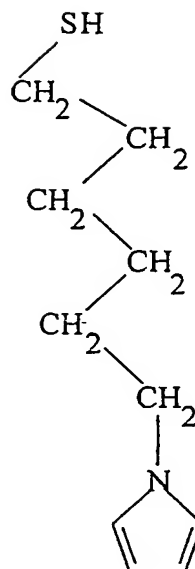


N-ETHYLAMINE PYRROLE

25

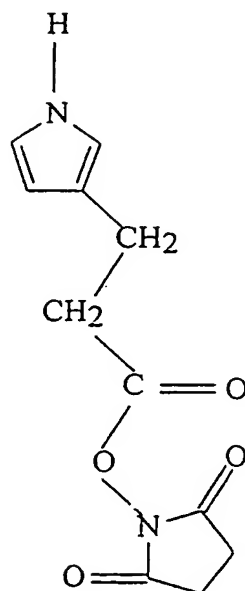


N(3-(TRIMETHOXY SILYL) PROPYL) PYRROLE



PYRROLE fonctionnalisé avec un thiol

5



PYRROLE fonctionnalisé en 3' par un ester succinimydyl.

Selon l'invention, le bain électrolytique peut
10 être un mélange de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé

en proportions adéquates pour former un film présentant un nombre désiré d'unités de pyrrole fonctionnalisé. Ainsi, le procédé de l'invention permet de choisir le nombre de sondes biologiques par microcuvette, car
5 selon ce procédé, les sondes biologiques sont fixées, soit directement, soit indirectement, sur ces pyrroles fonctionnalisés.

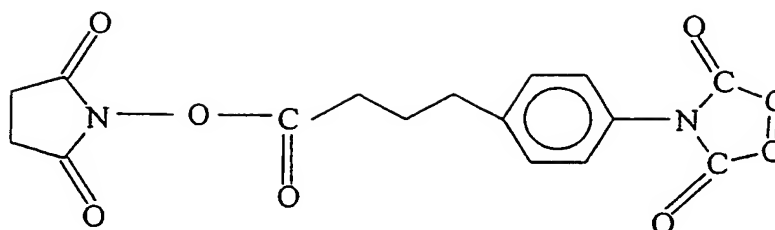
L'étape c) suivante du procédé de l'invention consiste en une fixation directe ou indirecte d'une
10 sonde biologique sur le pyrrole fonctionnalisé.

Selon l'invention, lorsque la fixation de la sonde biologique est indirecte, l'étape c) du procédé de l'invention peut comprendre en outre, avant la fixation de la sonde biologique, une fixation
15 collective d'un agent de réticulation sur le pyrrole fonctionnalisé, en présence de réactifs chimiques appropriés, ledit agent de réticulation comportant une première fonction permettant sa fixation sur le pyrrole fonctionnalisé, et une deuxième fonction permettant la
20 fixation de la sonde biologique sur ledit agent de réticulation.

Selon l'invention, l'agent de réticulation peut par exemple être un agent de réticulation bifonctionnel.

25 L'agent de réticulation peut par exemple présenter une fonction ester de la N-hydroxysuccinimide et une fonction maléimide.

Selon l'invention, l'agent de réticulation peut par exemple être choisi parmi un des composés
30 suivants :



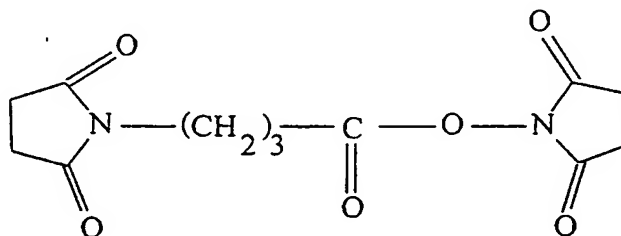
ester de N-hydroxysuccinimide

fonction maléique

SMPB

succinimidyl 4-(p-maléimidophényl)butyrate

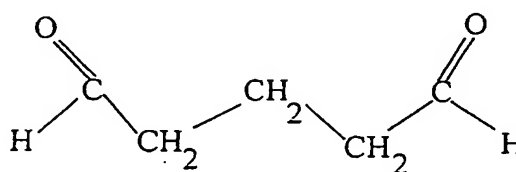
5



GMBS

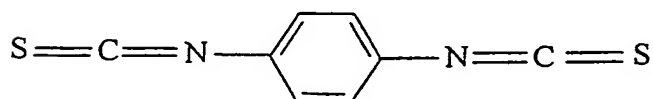
N-maléimidobutyryloxy succinimide ester,
un dialdéhyde du type

10

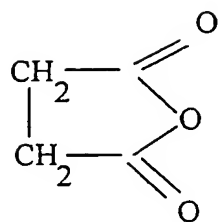


GLUTARALDEHYDE,
un diisothiocyanate du type

15



1,4-PHENYLENE DIISOTHIOCYANATE,



ANHYDRIDE SUCCINIQUE ou acide succinique

5 ou un dérivé de ces composés.

Tous les agents de réticulation bi-fonctionnels précités sont bien adaptés pour les polypyrroles fonctionnalisés avec le groupement $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ en position 1 sur l'azote. Mais une électropolymérisation
10 avec un pyrrole fonctionnalisé avec d'autres groupements sont aussi possibles. Par exemple $\text{Py}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$, $\text{Py}-\text{SH}$, Py -succinimidyl ester (en 3), Py -hydrazine avec une substitution en 1 sur l'azote ou en 3 sur le cycle pyrrole, permettant d'immobiliser les
15 oligonucléotides, soit directement, soit par l'intermédiaire d'un agent de réticulation, par exemple bi-fonctionnel.

Les agents de réticulation suivants peuvent donc être utilisés dans le procédé de la présente
20 invention :

a) un dialdéhyde du type glutaraldéhyde, qui peut réagir sur les fonctions NH_2 du film de polypyrrole (étape collective) puis sur la fonction NH_2 d'un oligonucléotide terminé par
25 exemple par un phosphate portant un groupement aminé, par une étape individuelle dans les microcuvettes ;

b) un diisothiocyanate qui peut également réagir sur la fonction amine du polypyrrole

fonctionnalisé par une extrémité (étape collective) puis sur une fonction amine d'un oligonucléotide terminé par un phosphate avec un groupement espaceur fonctionnalisé avec
5 NH₂ ;

c) un anhydride succinique qui par ouverture met en jeu deux fonctions acides capables de réagir sur les NH₂ du polypyrrole et d'autre part sur les NH₂ d'un oligonucléotide fonctionnalisé avec NH₂.
10

Selon l'invention, la sonde biologique qui va être à l'origine de la spécificité de la biopuce fabriquée, peut être choisie par exemple parmi un oligonucléotide, un ADN, un ARN, un peptide, un
15 glucide, un lipide, une protéine, un anticorps, un antigène.

Selon l'invention la sonde biologique est de préférence fonctionnalisée pour pouvoir être fixée soit directement, soit indirectement sur le pyrrole fonctionnalisé. Cette fonctionnalisation a pour but de
20 fixer sur la sonde biologique un groupement chimique capable de former une liaison covalente entre la sonde biologique et le pyrrole fonctionnalisé.

Elle peut être par exemple fonctionnalisée avec
25 un groupement thiol, avec un groupement NH₂, aldéhyde, un groupement -COOH ou encore un groupement phsopahte acide.

Par exemple lorsque la sonde biologique est un oligonucléotide, elle peut être fonctionnalisée avec un
30 groupement thiol (SH). Les oligonucléotides fonctionnalisés avec S-H peuvent être préparés selon une procédure connue, par exemple en fin d'une synthèse automatisée d'oligonucléotides.

Dans un cas où il est plus facile de disposer d'oligonucléotides fonctionnalisés avec NH_2 , il est possible par exemple de synthétiser un pyrrole fonctionnalisé avec un S-H pour la copolymérisation, d'utiliser par exemple SMPB avec ses deux fonctions spécifiques et d'immobiliser les oligonucléotides fonctionnalisés avec NH_2 par liaison covalente avec la fonction succinamide de cet agent de réticulation.

Dans le cas d'oligonucléotides terminés en 3' par un nucléotide N-méthyl uridine, une réaction d'oxydation sur cette fonction permet d'obtenir un oligonucléotide fonctionnalisé avec une fonction aldéhyde, capable de réagir directement, c'est-à-dire par exemple sans l'agent bifonctionnel sur le polypyrrole fonctionnalisé avec NH_2 .

Pour fonctionnaliser un oligonucléotide avec une fonction NH_2 , l'une des méthodes utilisables selon le procédé de la présente invention peut consister à faire un couplage entre l'oligonucléotide et le N-trifluoroacétyl-6 amino hexyl-2 cyanoéthyl NN'-diisopropyl phosphoramidite disponible dans le commerce.

Par ailleurs, un oligonucléotide fonctionnalisé avec NH_2 peut par exemple être converti en oligonucléotide terminé par un thiol par une réaction avec le dithiobis (succinimidylpropionate).

Les oligonucléotides sondes fonctionnalisés peuvent par exemple être prélevés par micropipetage dans des micropuits et injectés dans les microcuvettes par exemple par l'intermédiaire d'un microrobot dispenseur ou par impression par jets. Ces appareils sont bien connus de l'homme du métier.

Le procédé de la présente invention permet
avantageusement de choisir le nombre de sondes par site
actif, c'est-à-dire par microcuvette en jouant sur la
proportion de pyrrole fonctionnalisé par rapport au
5 pyrrole.

La densité de sondes souhaitée peut être
contrôlée par exemple par fixation d'oligonucléotides
marquées en extrémité de chaînes par une biotine et en
utilisant la reconnaissance par streptavidine-Cy3 par
10 une analyse de surface de la puce par les méthodes
classiques de détection par fluorescence.

Un autre avantage du procédé de l'invention
réside dans le fait que les deux opérations
collectives, électropolymérisation et éventuellement
15 fixation de l'agent de réticulation, peuvent se faire
par lots sur un grand nombre de plaquettes en
parallèle.

Les plaquettes ayant subi les étapes a) et b)
du procédé de l'invention sont aussi appelées "ébauches
20 de biopuces". Elles sont prêtes à être soumises à
l'étape de fixation directe ou indirecte d'une sonde
biologique, par exemple d'un oligonucléotide conforme à
la présente invention.

25 Ainsi, le procédé de l'invention permet par
exemple de fabriquer une puce oligonucléotidique
comprenant dans cet ordre :

- soit un substrat de silicium recouvert de silice, et
d'une couche de silane fonctionnalisé avec des
30 pyrroles,
- soit une couche d'or ou une couche silane présentant
des sites pyrroles,

- soit une couche d'or avec ou sans une couche de promotion et d'adhérence de l'électropolymérisation (basée sur un pyrrole fonctionnalisé avec un thiol -SH),
- 5 - soit une couche d'aluminium avec un pyrrole fonctionnalisé avec un -COOH,
- et une couche de résine dans laquelle des microcuvettes ont été réalisées de telle sorte que le fond desdites microcuvettes est constitué au moins en partie de la couche d'or ou de la couche de silane présentant des sites pyrroles,
- 10 - et une couche d'un copolymère de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé, fixée sur la couche d'or ou la couche de silane présentant des sites pyrroles
- 15 constituant le fond desdits microcuvettes, le pyrrole fonctionnalisé étant lié ou non à un agent de réticulation bifonctionnel,
- et un oligonucléotide fixé directement sur le pyrrole fonctionnalisé, ou indirectement sur le
- 20 pyrrole fonctionnalisé par l'intermédiaire de l'agent de réticulation lié au pyrrole.

D'autres avantages et caractéristiques de la présente invention apparaîtront encore à la lecture de la description qui suit, donnée bien entendu à titre illustratif et non limitatif, en référence aux dessins en annexe.

Brève description des figures

- 30 - La figure 1 est un schéma d'une vue en coupe d'un substrat structuré selon un premier mode de réalisation des étapes a) et b) du procédé de la présente invention.

- La figure 2 est un schéma d'une vue en coupe d'un substrat structuré selon le mode de réalisation représenté sur la figure 1, et comprenant en outre un agent de réticulation pour une fixation indirecte d'une
5 molécule biologique.

- La figure 3 est un schéma d'une vue en coupe d'un substrat structuré représenté sur la figure 2, illustrant la fixation indirecte d'un oligonucléotide sur l'agent de réticulation.

10 - La figure 4 est un schéma d'une vue en coupe d'un substrat structuré selon un second mode de réalisation du procédé de la présente invention.

- La figure 5 est un schéma d'une vue en coupe d'un substrat structuré selon un troisième mode de réalisation des étapes a) et b) du procédé de la
15 présente invention.

EXEMPLES

Exemple 1 : Fabrication d'une biopuce constituée notamment d'oligonucléotides greffés sur un polymère conducteur selon un premier mode de réalisation de la
20 présente invention.

Selon ce premier mode de réalisation, relatif notamment à l'étape a) du procédé de l'invention, une
25 couche d'or est déposée sur une plaquette de silicium de manière à former une électrode de travail pour l'électropolymérisation d'un copolymère de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé. Cette couche d'or est déposée par une technique classique d'évaporation sous
30 vide ou pulvérisation cathodique. Elle a une épaisseur d'environ 1000 à 5000 Å et constitue l'électrode de travail collective.

Une résine photosensible est déposée sur l'électrode en or et une étape de photolithographie permet de pratiquer des ouvertures dans la résine de manière à former des microcuvettes comportant
5 l'électrode de travail dans leur fond, ces microcuvettes peuvent être adressées simultanément.

La résine utilisée est de préférence :

- a) une résine photosensible de type positif (Novolaque + diézonaphtoquinone à développement
10 en milieu alcalin) ;
- b) une résine photosensible négative de type Polyimide (OLIN) à développement dans un solvant organique ;
- c) soit un polymère gravé par gravure sèche ou
15 humide.

Les microcuvettes formées ont une dimension de 100x100x30 µm.

La résine est déposée sur l'électrode en or par une technique classique de centrifugation à la
20 tournette ("spinning"). Un substrat structuré selon l'étape a), du procédé de la présente invention est ainsi obtenu.

L'étape b) d'électropolymérisation collective est réalisée en utilisant une solution de pyrrole et de
25 pyrrole fonctionnalisé.

Dans cet exemple, le pyrrole fonctionnalisé est le N-éthylaminepyrrole, et la solution utilisée pour l'électropolymérisation est une solution aqueuse/éthanol ou acétonitrile comprenant 0,1 mole de
30 pyrrole, et un rapport molaire pyrrole fonctionnalisé/pyrrole de 5% à 0,5% en poids de pyrrole fonctionnalisé. Cette solution est appelée ci-après bain électrolytique.

L'obtention du monomère de pyrrole fonctionnalisé avec une fonction NH_2 est aisée et est décrite par exemple dans I. Jirkowsky, R. Baudy, Synthesis 1981, p. 481.

5 L'électropolymérisation est réalisée par trempage dans le bain électrolytique du substrat structuré obtenu précédemment, avec des réactifs appropriés pour l'électrochimie. Ces réactifs sont par exemple des sels électrolytiques ($\text{Li}^+\text{ClO}_4^-$, sels
10 d'ammonium quaternaires, Li-toxylate, ou du polystyrène sulfonate de lithium, de potassium ou de sodium).

Les solvants pour l'électropolymérisation sont, par exemple, le CA_3CN , l'eau, l'éthanol et les mélanges eau-éthanol. Le pyrrole contenu dans le bain présente
15 une concentration de l'ordre de 10^{-1} à 10^{-3} M/l.

Une contre-électrode en platine et une électrode de référence au calomel trempent dans le bain électrolytique et sont indépendantes de la plaquette de silicium, seule l'électrode de travail est intégrée à
20 la structure de la plaquette.

Un film de copolymère de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé est ainsi formé et déposé uniquement sur le fond des microcuvettes par électrodéposition.

La figure 1 est un schéma d'une vue en coupe du
25 substrat obtenu selon ce premier mode de réalisation du procédé de la présente invention. Sur cette figure, la référence 1 se rapporte au substrat structuré formé dans cet exemple, constitué d'une plaquette de silicium 3, d'une couche d'or 5, et d'une couche de résine
30 photosensible 7. La référence 9 se rapporte à la liaison de la couche d'or avec un générateur de courant électrique pour l'électropolymérisation, la référence 10 à une microcuvette, et les références 11 et 13 se

rapportent au copolymère de pyrrole (référence 11) et de N-éthylamine pyrrole (référence 13) formé par électrodéposition sur la couche d'or 5 au fond de la microcuvette 10.

5 Dans cet exemple, l'étape c) de fixation de la molécule biologique est une étape de fixation indirecte. Elle comprend la fixation d'un agent de réticulation sur la fonction NH_2 du N-éthylamine pyrrole électrodéposé sur le fond des microcuvettes.

10 L'agent de réticulation utilisé dans cet exemple est le succinimidyl 4-(p-maléimidophényl) butyrate) (SMPB) décrit précédemment.

Cette fixation est réalisée en formant une liaison covalence entre la fonction NH_2 du pyrrole fonctionnalisé et la fonction succinate du SMPB.

15 Elle est réalisée par trempage du substrat précédemment formé dans une solution 10^{-3}M de SMPB dans un solvant (diméthylformamimide).

Le polypyrrole formé est insoluble dans cette solution et dans la majorité des solvants courants.

20 La figure 2 est un schéma d'une vue en coupe du substrat structuré ainsi obtenu. Sur ce schéma, la référence 1 se rapporte au substrat structuré représenté sur la figure 1, et la référence 15 se rapporte à l'agent de réticulation SMPB. Cette figure 2 montre aussi la réaction entre le groupe succinimide de l'agent de réticulation et la fonction amine du pyrrole.

On a donc réalisé dans cet exemple des microcuvettes recouvertes d'un polypyrrole présentant une fonctionnalisation de surface, grâce au SMBP, de groupements réactifs de type maléimide.

Ces groupements maléimide de SMBP permettent la fixation de la sonde biologique sur le film de polypyrrole précédemment électrodéposé.

La sonde biologique utilisée dans cet exemple
5 est un mélange d'oligonucléotides fonctionnalisés avec un groupement thiol SH.

Les oligonucléotides ont été préparés par une synthèse automatisée classique, et fonctionnalisés avec un groupement thiol. Les oligonucléotides
10 fonctionnalisés sont prélevés par micropipetage dans des micropuits et injectés dans les microcuvettes par l'intermédiaire d'un microrobot dispenseur.

La figure 3 est un schéma d'une vue en coupe du substrat structuré représenté sur la figure 2,
15 illustrant la fixation de l'oligonucléotide sur l'agent de réticulation. Sur cette figure, la référence 1 se rapporte au substrat structuré formé dans cet exemple, les références 11 et 13, comme sur les figures 1 et 2, se rapportent au copolymère de pyrrole et de
20 N-éthylamine pyrrole, la référence 15 à l'agent de réticulation SMBP représenté sur la figure 2 et la référence 17 se rapporte à un oligonucléotide. Cette figure 3 montre aussi la réaction entre la fonction maléimide de l'agent de réticulation et
25 l'oligonucléotide -SH.

La densité de sonde a été analysée par fixation d'oligonucléotides marqués par une biotine (référence 19 sur la figure 3) et en utilisant une reconnaissance par la streptavidine Cy3 (référence 21 sur la figure
30 3).

L'analyse a été réalisée par une méthode classique de détection par fluorescence, appliquée au couple biotine-streptavidine.

Exemple 2 : Fabrication d'une biopuce constituée notamment de sondes d'oligonucléotides greffées sur un polymère conducteur selon un second mode de réalisation du procédé de la présente invention.

Selon ce deuxième mode de réalisation, relatif notamment à l'étape a) du procédé de l'invention, une résine photosensible négative est déposée sur une plaquette de silicium recouverte d'un film naturel de SiO_2 .

Comme dans l'exemple 1, des microcuvettes sont alors formées par photolithographie de telle manière que le fond des microcuvettes, appelées aussi ci-après sites, soit constitué par la couche d'oxyde de silicium.

On procède ensuite à une fonctionnalisation des sites par silanisation : cette fonctionnalisation est une étape collective du procédé de l'invention, elle est réalisée par trempage de la plaquette de silicium comportant les microcuvettes formées précédemment dans une solution d'un agent de silanisation fonctionnalisé avec un pyrrole dans un solvant approprié. L'agent de silanisation est le N-(3-(triméthoxysilyl)propyl) pyrrole, et le solvant est un mélange éthanol/eau (95/5) ou du toluène.

On obtient sur le fond des microcuvettes, ou sites, une monocouche de silane présentant un alignement régulier de sites pyrrole.

Cette monocouche est capable d'initier et de promouvoir l'adhésion d'un film de polypyrrole par électropolymérisation : elle forme une électrode de travail pour l'électropolymérisation collective du procédé de la présente invention.

L'électropolymérisation sur une telle monocouche est par exemple décrite dans l'article de R. Simon et Coll; J. Am. Chem. Soc. 1982, 104, 2031.

5 L'étape suivante est l'étape b) du procédé de l'invention, d'électropolymérisation d'un copolymère de pyrrole et de N-éthylamine pyrrole noté ci-après Py et Py-R-F, où R et F sont respectivement un groupement espaceur et une fonction chimique réactive.

10 La plaquette de silicium fonctionnalisée par le silane pyrrole constitue en fait l'anode d'une cellule d'électrolyse. Elle est plongée dans un bain électrolytique approprié, contenant les deux polymères, une contre-électrode et une électrode de référence.

15 Le bain électrolytique comprend outre Py et Py-R-F des sels électrolytiques de Li^+ dans un solvant eau/éthanol ou acétonitrile.

20 La contre-électrode est une électrode de platine. Au cours de l'électropolymérisation, les noyaux pyrrole et pyrrole substitué viennent s'insérer et se lier aux motifs pyrrole de la monocouche de silane.

La figure 4 en annexe illustre le produit ainsi obtenu, elle montre aussi la formation de liaisons covalentes entre les différents cycles pyrrole.

25 Sur cette figure, la référence 32 se rapporte à la plaquette de silicium, la référence 34 à la couche de résine photosensible, la référence 35 à une microcuvette, la référence 36 à la monocouche de silane, et la référence 38 à la couche de copolymère de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé.

30

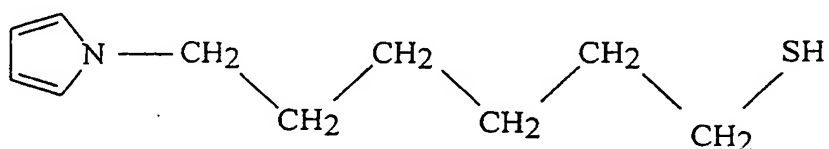
La fabrication de la biopuce est achevée comme dans l'exemple 1 :

- réactions avec l'agent de réticulation bifonctionnel : étape collective,
- immobilisation des sondes d'oligonucléotides fonctionnalisés avec un groupement thiol (-S-H) par adressage mécanique avec un robot par impression à jets de liquide (tête piézoélectrique) de type GESIM ou avec un robot de type BROWN.

Exemple 3 : Fabrication d'une biopuce constituée notamment de sondes d'oligonucléotides greffés sur un polymère conducteur selon un troisième mode de réalisation du procédé de la présente invention.

Dans cet exemple de réalisation du procédé de la présente invention, les microcuvettes ont été réalisées par photolithographie d'une résine déposée sur une électrode d'or à la surface d'une plaquette de silice comme dans l'exemple 1 précédent.

Il a ensuite été procédé à une thiolisation de la couche d'or au fond des microcuvettes par un pyrrole fonctionnalisé avec un groupement -SH de formule suivante :



La réaction a été réalisée par trempage de la plaquette précitée dans une solution contenant le pyrrole fonctionnalisé avec un thiol dans un solvant comme le diméthylformamide (DMH) par exemple.

Le thiol s'est accroché sur l'or au fond des microcuvettes pour former une monocouche de pyrrole.

L'ensemble couche d'or et pyrrole fixé sur celle-ci formant une électrode de travail pour l'électropolymérisation collective de l'étape b) du procédé de l'invention. En fait, l'échantillon sert
5 d'anode pour l'amorçage collectif de l'électropolymérisation.

Les étapes b) et c) du procédé de l'invention ont alors été réalisées comme dans les exemples 1 et 2 précédents.

10 La figure 5 en annexe est un schéma illustrant le produit obtenu dans cet exemple. Il s'agit d'une vue en coupe d'un substrat structuré 40 comprenant une plaquette de silicium 42, une couche d'or 44, une couche de résine 46 photosensible dans laquelle sont
15 formées des microcuvettes 48, une monocouche de pyrrole 50 accrochée sur l'or au fond des microcuvettes, et un film 52 de copolymère de pyrrole (Py) et de pyrrole

F
|
— Py —

fonctionnalisé (— Py —). Sur cette figure, les flèches courbes indiquent l'électrodéposition du film
20 précité sur le pyrrole 50 fonctionnalisé accroché par des groupements thiol sur l'or au fond des microcuvettes.

Exemple 4 : Compléments

25 Une autre approche consiste à utiliser un dépôt de polypyrrole fonctionnalisé, comme :

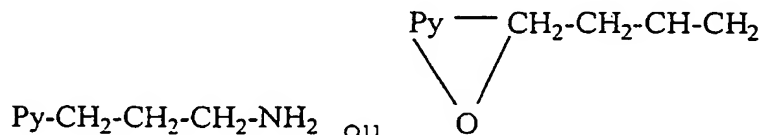
- soit un support d'immobilisation d'oligonucléotides,
- soit un support pour le démarrage d'une
30 synthèse in situ de l'oligonucléotide.

Cette technique permet de remplacer avantageusement une étape de silanisation dans laquelle une monocouche est plus difficile à réaliser, par un film de polymère comportant une épaisseur et un nombre
 5 de sites fonctionnels bien contrôlés.

Pour ce faire, on réalise par électropolymérisation des films d'un copolymère comportant une proportion donnée de pyrrole fonctionnalisé par rapport au pyrrole. Ces films de
 10 polypyrrole, déposés sur une électrode d'or, au lieu de silicium ou verre, montrent une fluorescence parasite d'intensité bien inférieure à celle observée avec les autres substrats.

La fonctionnalisation peut se faire :

- 15 1. sur l'azote du pyrrole par une fonction NH_2 ou époxy, par exemple :



Ces fonctions peuvent servir à la fois à
 20 l'immobilisation de sondes et à la synthèse in situ ;

2. en position 1, 2 ou 3 du pyrrole par une fonction oxyamine ($\text{R}-\text{ONH}_2$) ou carbonyle (R , $\text{R}'\text{C}=\text{O}$ avec de préférence $\text{R}'=\text{CH}_3$). Dans ce cas,
 25 ces fonctions servent uniquement à l'immobilisation de sondes. L'oligonucléotide présente de préférence soit une fonction carbonyle, soit une fonction oxyamine selon le substrat. La réaction de couplage oxyamine-carbonyle présente l'avantage d'être très
 30 rapide et conduit à des temps d'immobilisation

inférieurs à 10 minutes, contrairement à quelques heures comme dans le cas précédent ;

- 5 3. sur l'azote du pyrrole par un nucléotide comportant préférentiellement une base T. Cette fonctionnalisation sert à l'immobilisation de sondes comportant un groupement psoralène en 5'. Ce groupement réagit sous l'action de la lumière à 365 nm pour effectuer une cycloaddition entre la double liaison du psoralène et la double liaison 5,6 de la
- 10 Thymine ; le temps de réaction est relativement rapide : environ 15 min.

REVENDICATIONS

1. Procédé de fabrication d'une ébauche de biopuce, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 5 a) structuration d'un substrat de manière à obtenir sur ce substrat des microcuvettes comprenant dans leur fond une couche d'un matériau capable d'initier et de promouvoir l'adhésion sur celle-ci d'un film d'un copolymère de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé
10 par électropolymérisation,
- b) électropolymérisation collective, de manière à former un film électropolymérisé d'un copolymère de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé sur le fond desdites microcuvettes, sur la couche dudit
15 matériau, à partir d'une solution de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé, en présence de réactifs chimiques appropriés pour ladite électropolymérisation.

- 20 2. Procédé de fabrication d'une biopuce comprenant la fabrication d'une ébauche de biopuce selon les étapes a) et b) de la revendication 1 et comprenant en outre une étape c) de fixation directe, ou indirecte, d'une sonde biologique sur le pyrrole
25 fonctionnalisé, par injection d'une solution de la sonde biologique, au choix dans une ou plusieurs microcuvette(s) en présence de réactifs chimiques nécessaires à la fixation directe, ou indirecte, de cette sonde biologique sur le pyrrole fonctionnalisé.

30

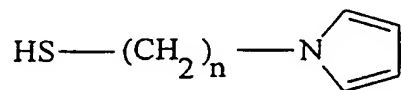
3. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la couche du matériau capable d'initier et de promouvoir l'adhésion du film de polypyrrole par

électropolymérisation étant une couche métallique, l'étape a) comprend une étape de dépôt de ladite couche métallique sur le substrat, et une étape de dépôt d'une couche de résine sur la couche métallique et de gravure de ladite couche de résine de manière à former les microcuvettes dont le fond est constitué au moins en partie de la couche métallique.

4. Procédé selon la revendication 3, dans lequel la couche métallique est une couche d'or.

5. Procédé selon la revendication 3 ou 4, dans lequel l'étape a) comprend en outre, une étape de traitement chimique de la couche d'or au fond des microcuvettes en présence d'un pyrrole fonctionnalisé avec un groupement thiol de manière à former une monocouche de pyrrole sur ladite couche d'or, au fond desdites microcuvettes.

6. Procédé selon la revendication 5, dans lequel le pyrrole fonctionnalisé avec un groupement thiol a la formule chimique suivante :



dans laquelle n a une valeur allant de 2 à 10.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel le substrat est une plaquette de silicium.

8. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le substrat est une plaquette de silicium et

dans lequel la couche capable d'initier et de promouvoir l'adhésion sur celle-ci du film de polypyrrole par électropolymérisation étant une couche de silane présentant un alignement de sites pyrrole, l'étape a) comprend une étape de dépôt d'une couche de résine sur la plaquette de silicium, ladite plaquette de silicium étant recouverte d'un film de SiO_2 , et de gravure de ladite couche de résine de manière à former les microcuvettes dont le fond est constitué au moins en partie du film de SiO_2 ; et une étape de traitement des microcuvettes au moyen d'un agent de silanisation fonctionnalisé avec un pyrrole de manière à fixer sur le film de SiO_2 , dans le fond des microcuvettes, la couche de silane présentant un alignement de sites pyrroles.

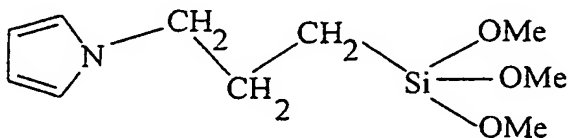
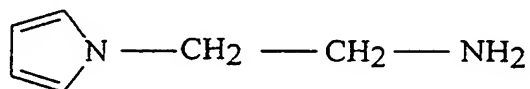
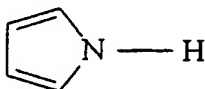
9. Procédé selon la revendication 8, dans lequel l'agent de silanisation est choisi dans un groupe comprenant le N-(3-(triméthoxy silyl)propyl) pyrrole, ou tout autre pyrrole fonctionnalisé avec un groupement $-\text{SiCl}_3$ ou $-\text{Si}(\text{OMe})_3$.

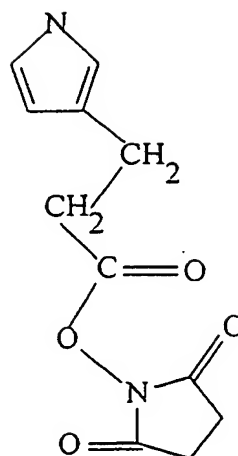
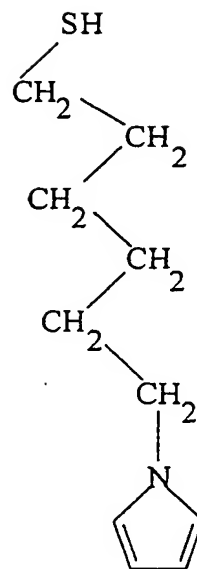
10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans lequel l'électropolymérisation collective est réalisée par trempage du substrat structuré obtenu à l'étape a) dans un bain électrolytique comprenant une solution de pyrrole, de pyrrole fonctionnalisé, et de réactifs chimiques appropriés pour l'électropolymérisation, en présence d'une contre-électrode qui trempe dans le bain électrolytique et est indépendante du substrat structuré, la couche de matériau capable d'initier et de promouvoir l'adhésion sur celle-ci du film de

copolymère de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé formant une électrode de travail.

11. Procédé selon l'une quelconque des
5 revendications 1 à 10, dans lequel le pyrrole fonctionnalisé est un pyrrole comportant un groupement choisi dans un ensemble comprenant un groupement NH_2 , un groupement thiol, un groupement ester de la N-hydroxysuccinimide, un groupement triméthoxy silyl, un
10 groupement carboxylique, aldéhyde, isothiocyanate.

12. Procédé selon l'une quelconque des
revendications 1 à 10 dans lequel le pyrrole fonctionnalisé est choisi parmi un des composés
15 suivants :





5

13. Procédé selon la revendication 2 dans lequel la fixation de la sonde biologique étant indirecte, ledit procédé comprend en outre, dans l'étape c), avant la fixation de la sonde biologique, une fixation collective d'un agent de réticulation sur le pyrrole fonctionnalisé, en présence de réactifs chimiques appropriés, ledit agent de réticulation

comportant une première fonction permettant sa fixation sur le pyrrole fonctionnalisé, et une deuxième fonction permettant la fixation de la sonde biologique sur ledit agent de réticulation.

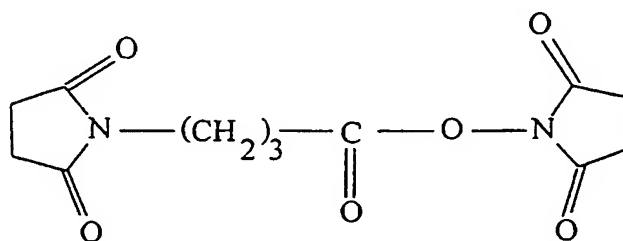
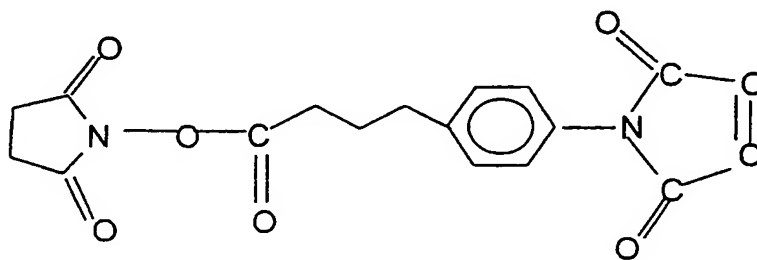
5

14. Procédé selon la revendication 13, dans lequel l'agent de réticulation est choisi dans un ensemble comprenant un dialdéhyde, un diisothiocyanate, un diacide, un anhydride succinique, ou un dérivé de ces composés.

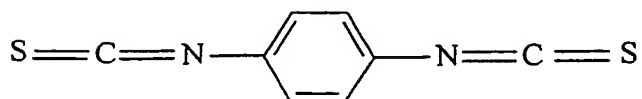
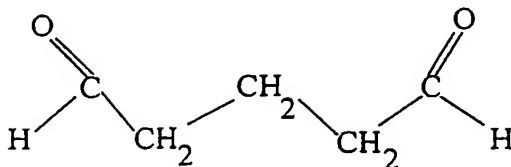
10

15. Procédé selon la revendication 13, dans lequel l'agent de réticulation est choisi parmi un des composés suivants :

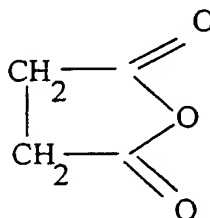
15



20



5



10 16. Procédé selon la revendication 2, dans lequel la sonde biologique est choisie parmi un oligonucléotide, un ADN, un ARN, un peptide, un glucide, un lipide, une protéine, un anticorps, un antigène.

15 17. Procédé selon la revendication 2, dans lequel la sonde biologique est un oligonucléotide fonctionnalisé pour être fixé soit directement, soit indirectement sur un pyrrole fonctionnalisé.

20 18. Procédé selon la revendication 17, dans lequel l'oligonucléotide est fonctionnalisé avec un groupement thiol.

19. Ebauche de biopuce comprenant dans cet ordre :

- un substrat,
- une couche d'un matériau capable d'initier et de
5 promouvoir l'adhésion sur celle-ci d'un film d'un
copolymère de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé
par électropolymérisation,
- une couche de résine recouvrant ladite couche de
matériau capable d'initier et de promouvoir
10 l'adhésion sur celle-ci d'un film d'un copolymère du
pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé, dans laquelle
des microcuvettes ont été réalisées de telle sorte
que le fond desdites microcuvettes est constitué au
moins en partie de la couche dudit matériau,
- 15 - une couche d'un copolymère de pyrrole et de pyrrole
fonctionnalisé, fixée sur ledit matériau constituant
le fond desdits microcuvettes.

20. Biopuce comprenant dans cet ordre :

- 20 - un substrat de silice,
- une couche d'or ou une couche silane présentant des
sites pyrroles,
- une couche de résine recouvrant la couche d'or ou la
couche de silane présentant des sites pyrroles, dans
25 laquelle des microcuvettes ont été réalisées de
telle sorte que le fond desdites microcuvettes est
constitué au moins en partie de ladite couche d'or
ou de ladite couche de silane présentant des sites
pyrroles,
- 30 - une couche d'un copolymère de pyrrole et de pyrrole
fonctionnalisé, fixée sur la couche d'or ou la
couche de silane présentant des sites pyrroles
constituant le fond desdits microcuvettes, le

pyrrole fonctionnalisé étant lié ou non à un agent de réticulation bifonctionnel, et

- un oligonucléotide fixé directement sur le pyrrole fonctionnalisé, ou indirectement sur le pyrrole fonctionnalisé par l'intermédiaire de l'agent de réticulation lié audit pyrrole.

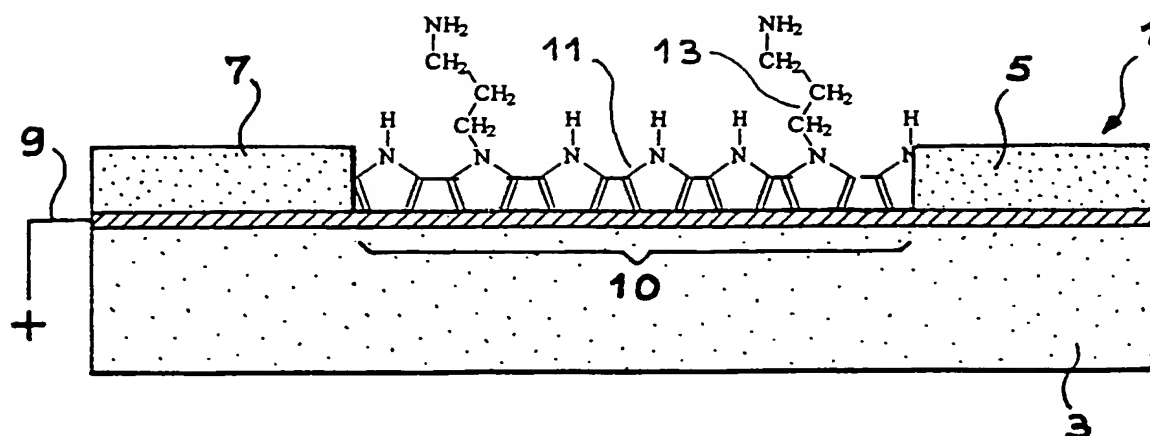


FIG. 1

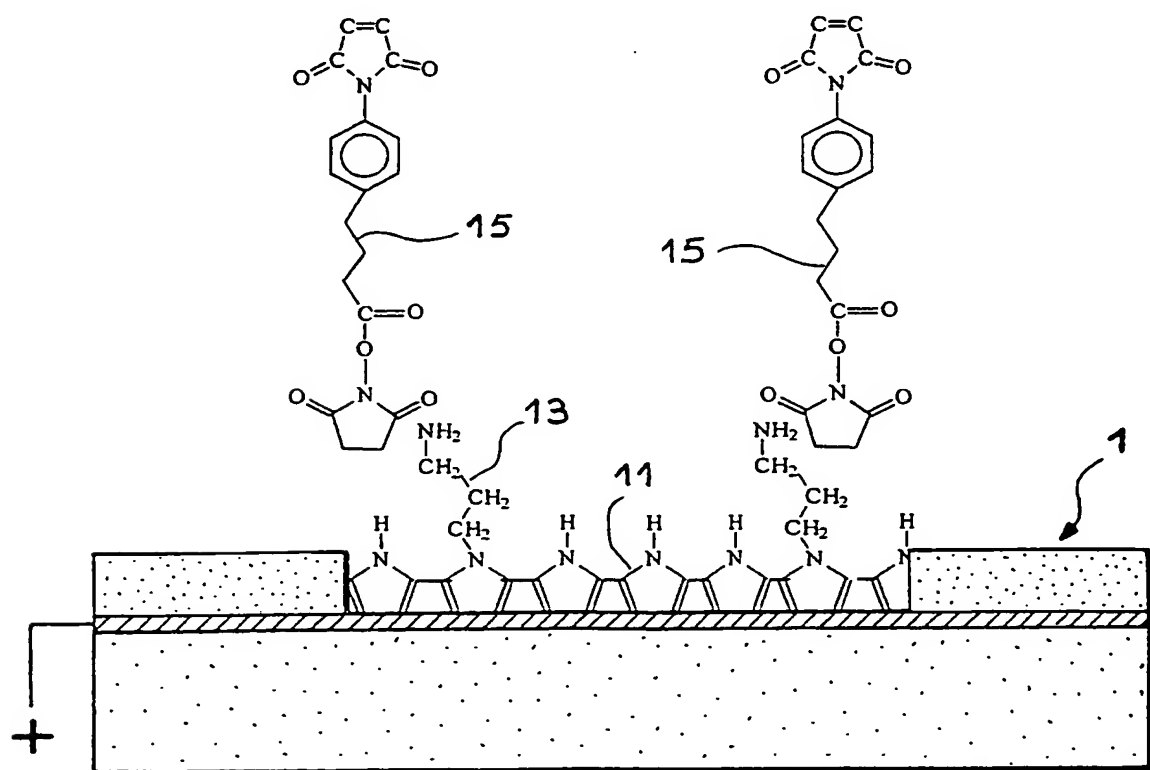


FIG. 2

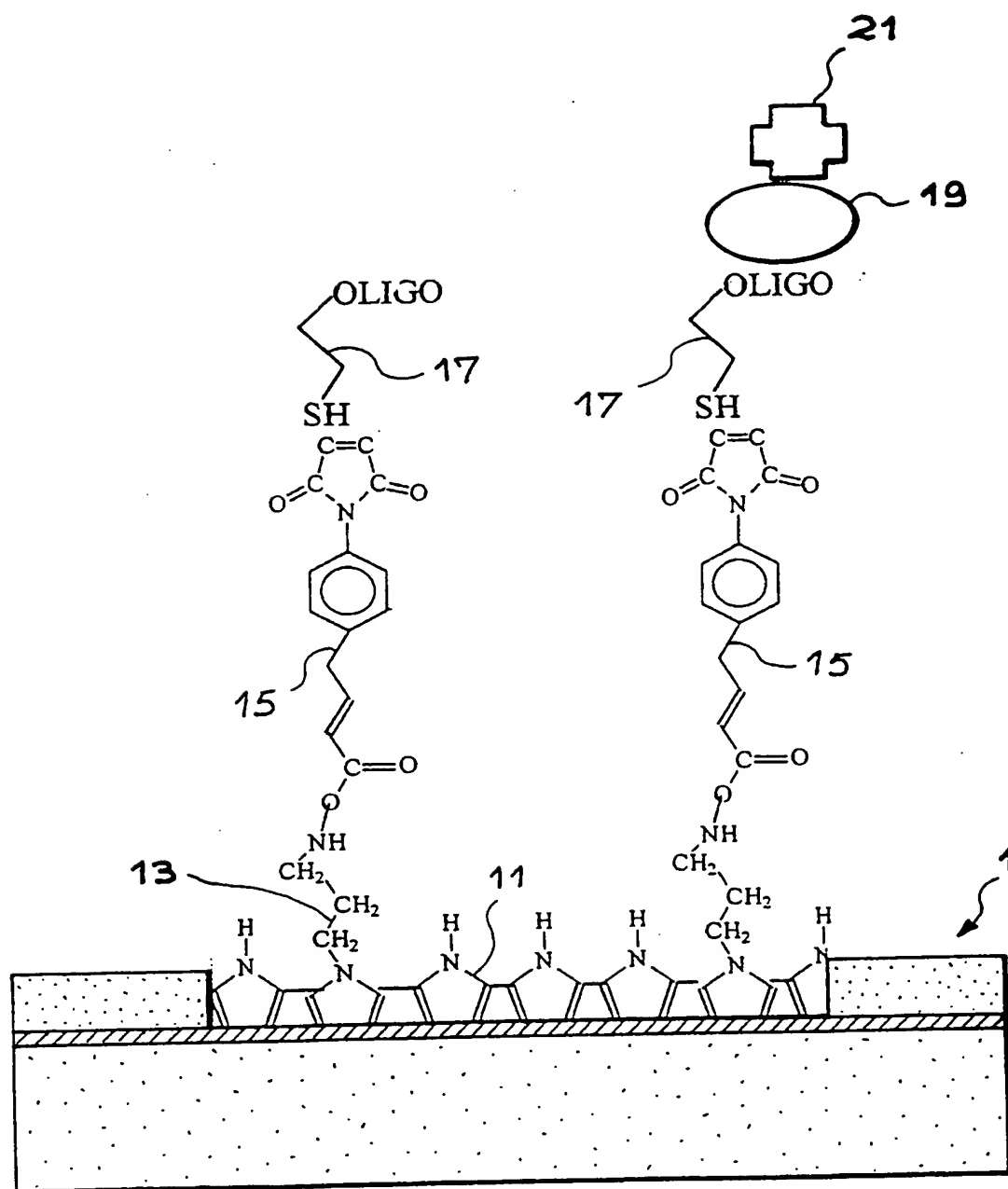


FIG. 3

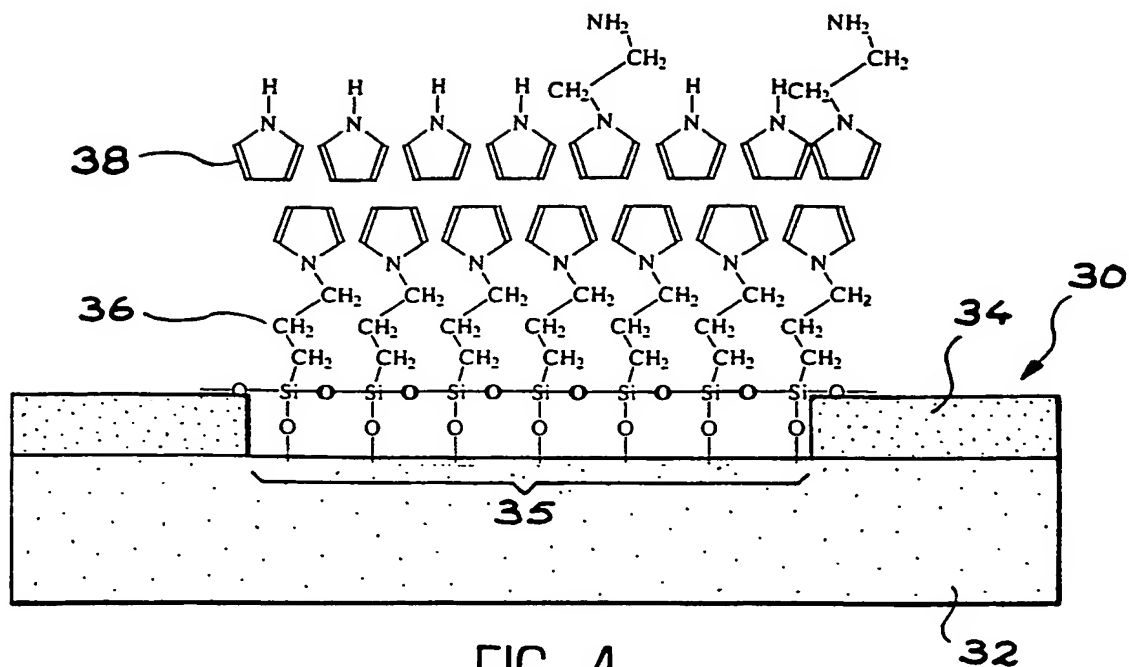


FIG. 4

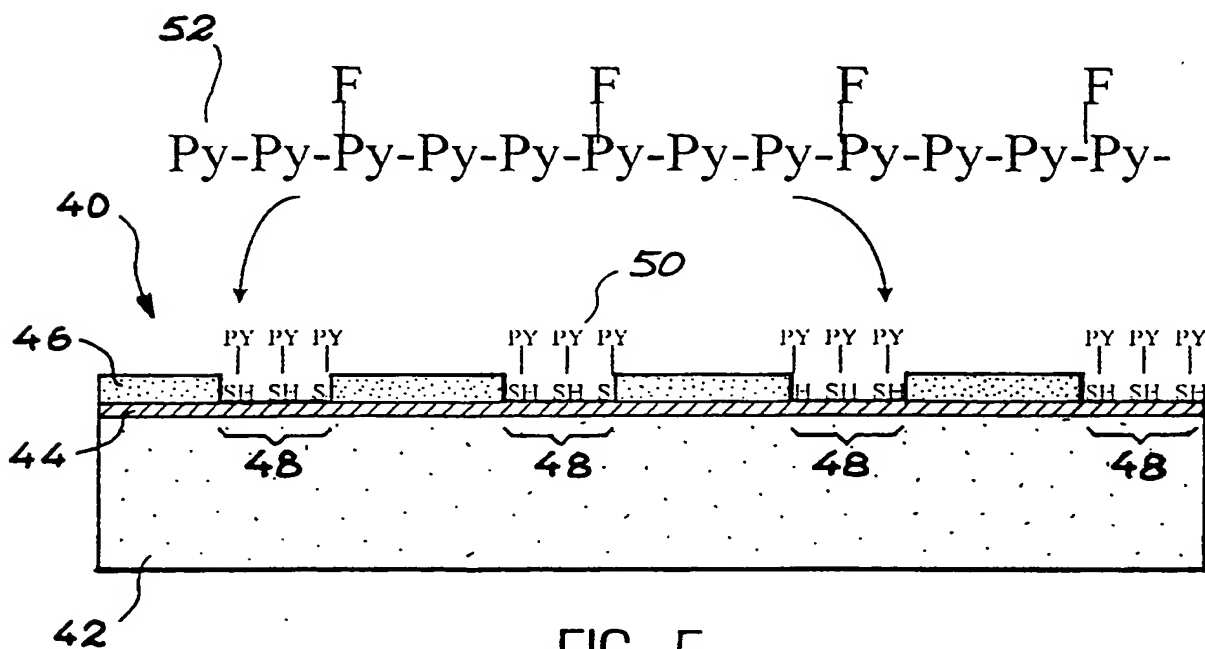


FIG. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No

PCT/FR 99/03141

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages. | Relevant to claim No. |
|----------|--|-------------------------------------|
| X | US 5 837 859 A (ROGET ANDRE ET AL) 17 November 1998 (1998-11-17) | 1-6, 10-17, 19,20 |
| Y | the whole document | 8 |
| X | LIVACHE T ET AL.: "Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 22, no. 15, 1994, pages 2915-2921, XP002114812 the whole document | 1,5,6, 10-14, 16,17, 19,20 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 March 2000

Date of mailing of the international search report

22/03/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Knehr, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int'l Application No
 FR 99/03141

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|---|-------------------------------|
| X | LIVACHE T ET AL.: "Electroconducting polymers for the construction of DNA or peptide arrays on silicon chips" BIOSENSORS & BIOELECTRONICS, vol. 13, 1998, pages 629-634, XP000869823 the whole document --- | 1-3, 19, 20 |
| X | LIVACHE T ET AL.: "Polypyrrole DNA chip on a silicon device: Example of hepatitis C virus typing" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 255, 1998, pages 188-194, XP002114813 abstract --- | 1-3, 19, 20 |
| Y | page 188, column 1, paragraph 1 -page 190, column 1, paragraph 1; figures 1,2 page 191, column 1, paragraph 1 -page 192, column 2, paragraph 3 --- | 6, 8, 10 |
| Y | EP 0 229 993 A (POLAROID CORP) 29 July 1987 (1987-07-29) the whole document --- | 1-4, 6-8, 10-12, 19, 20 |
| Y | US 5 653 939 A (KOSICKI BERNARD B ET AL) 5 August 1997 (1997-08-05) abstract column 11, line 11 - line 65; claims 1-9; figures 15, 16, 21, 22 --- | 1-4 |
| Y | EP 0 588 721 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 23 March 1994 (1994-03-23) the whole document --- | 1-3, 7 |
| Y | US 5 810 989 A (KRIHAK MICHAEL ET AL) 22 September 1998 (1998-09-22) the whole document --- | 1-3, 10 |
| Y | SIMON R A ET AL.: "Synthesis and characterization of a new surface derivatizing reagent to promote the adhesion of polypyrrole films to n-type silicon photoanodes: N-(3-(Trimethoxysilyl)propyl)pyrrole" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 104, 1982, pages 2031-2034, XP002114814 cited in the application the whole document --- | 8, 9, 11, 12 |
| | --- | |
| | -/-- | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/03141

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| Y | GUISEPPI-ELIE A AND WILSON A M: "Specific immobilization of electropolymerized polypyrrole thin films onto interdigitated microsensor electrode arrays" LANGMUIR, vol. 11, 1995, pages 1768-1776, XP002114815 abstract | 8,9,11, 19,20 |
| A | --- NISHIZAWA M ET AL.: "Electrochemical preparation of ultrathin polypyrrole film at microarray electrodes" JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY, vol. 95, 1991, pages 9042-9044, XP002114816 the whole document | |
| A | --- EP 0 659 794 A (LORRAINE LAMINAGE) 28 June 1995 (1995-06-28) the whole document | |
| A | --- EP 0 038 244 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 21 October 1981 (1981-10-21) the whole document | |
| P,X | --- BIDAN G ET AL.: "Conducting polymers as a link between biomolecules and microelectronics" SYNTHETIC METALS, vol. 102, 1999, pages 1363-1365, XP002114817 the whole document ----- | 1,2,19, 20 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

FR 99/03141

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 5837859 | A | 17-11-1998 | FR 2703359 A | 07-10-1994 |
| | | | AT 159028 T | 15-10-1997 |
| | | | DE 69406119 D | 13-11-1997 |
| | | | DE 69406119 T | 26-03-1998 |
| | | | DK 691978 T | 25-05-1998 |
| | | | EP 0691978 A | 17-01-1996 |
| | | | ES 2110228 T | 01-02-1998 |
| | | | WO 9422889 A | 13-10-1994 |
| | | | GR 3025738 T | 31-03-1998 |
| | | | JP 8508311 T | 03-09-1996 |
| EP 0229993 | A | 29-07-1987 | CA 1311715 A | 22-12-1992 |
| | | | JP 62181328 A | 08-08-1987 |
| | | | US 4724053 A | 09-02-1988 |
| US 5653939 | A | 05-08-1997 | US 5846708 A | 08-12-1998 |
| | | | EP 0638173 A | 15-02-1995 |
| | | | JP 7508831 T | 28-09-1995 |
| | | | WO 9322678 A | 11-11-1993 |
| | | | AT 176324 T | 15-02-1999 |
| | | | DE 69228291 D | 11-03-1999 |
| | | | DE 69228291 T | 02-06-1999 |
| | | | EP 0543550 A | 26-05-1993 |
| | | | JP 5322817 A | 07-12-1993 |
| | | | US 5532128 A | 02-07-1996 |
| | | | US 5670322 A | 23-09-1997 |
| | | | US 5891630 A | 06-04-1998 |
| EP 0588721 | A | 23-03-1994 | FR 2696043 A | 25-03-1994 |
| | | | JP 6188109 A | 08-07-1994 |
| US 5810989 | A | 22-09-1998 | NONE | |
| EP 0659794 | A | 28-06-1995 | FR 2714077 A | 23-06-1995 |
| | | | AT 177444 T | 15-03-1999 |
| | | | DE 69416971 D | 15-04-1999 |
| | | | DE 69416971 T | 07-10-1999 |
| | | | ES 2131654 T | 01-08-1999 |
| | | | JP 7331491 A | 19-12-1995 |
| | | | US 5522981 A | 04-06-1996 |
| EP 0038244 | A | 21-10-1981 | FR 2480314 A | 16-10-1981 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR 99/03141

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

IPC 7 C12Q1/68 G01N33/543

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

IPC 7 C12Q G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie* | Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | n° des revendications visées |
|------------|--|-------------------------------------|
| X | US 5 837 859 A (ROGET ANDRE ET AL) 17 Novembre 1998 (17.11.98) | 1-6, 10-17, 19,20 |
| Y | Le document en entier. | 8 |
| X | LIVACHE T ET AL.: "Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 22, no. 15, 1994, pages 2915-2921, XP002114812 le document en entier. | 1,5,6, 10-14, 16,17, 19,20 |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents.☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe.

* Catégories spéciales de documents cités :

"A" document définissant l'état général de la technique, n'étant pas considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais après la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour permettre de comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche a été effectivement achevée

15 Mars 2000 (15.03.00)

Date d'expédition du rapport de recherche

22 Mars 2000 (22.03.00)

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Fonctionnaire autorisé

Knehr, M

n° de télécopieur

n° de téléphone

| C (suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|--|--|-------------------------------|
| Catégorie* | Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | n° des revendications visées |
| X | LIVACHE T ET AL.: "Electroconducting polymers for the construction of DNA or peptide arrays on silicon chips" BIOSENSORS & BIOELECTRONICS, vol. 13, 1998, pages 629-634, XP000869823 le document en entier --- | 1-3, 19, 20 |
| X | LIVACHE T ET AL.: "Polypyrrole DNA chip on a silicon device: Example of hepatitis C virus typing" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 255, 1998, pages 188-194, XP002114813 | 1-3, 19, 20 |
| Y | abrégé page 188, colonne 1, alinéa 1 - page 190, colonne 1, alinéa 1; figures 1, 2 colonne 2, alinéa 3 --- | 6, 8, 10 |
| Y | EP 0 229 993 A (POLAROID CORP) 29 Juillet 1987 (29.07.87) le document en entier --- | 1-4, 6-8, 10-12, 19, 20 |
| Y | US 5 653 939 A (KOSICKI BERNARD B ET AL) 5 Aout 1997 (05.08.97) abrégé colonne 11, ligne 11 - ligne 65; revendications 1-9 figures 15, 16, 21, 22 --- | 1-4 |
| Y | EP 0 588 721 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 23 Mars 1994 (23.03.94) le document en entier --- | 1-3, 7 |
| Y | US 5 810 989 A (KRIHAK MICHAEL ET AL) 22 Septembre 1998 (22.10.98) le document en entier --- | 1-3, 10 |
| Y | SIMON R A ET AL.: "Synthesis and characterization of a new surface derivatizing reagent to promote the adhesion of polypyrrole films to n-type silicon photoanodes: N-(3-(Trimethoxysilyl)propyl)pyrrole" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 104, 1982, pages 2031-2034, XP002114814 cité dans la demande le document en entier --- | 8, 9, 11, 12 |
| | --- | |

-/-

PCT/FR 99/03141

| C (suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|--|--|------------------------------|
| Catégorie* | Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | n° des revendications visées |
| Y | GUISEPPI ELIE A AND WILSON A M: "specific immobilization of electropolymerized polypyrrole thin films onto interdigitated microsensor electrode arrays" LANGMUIR; vol. 11, 1995, pages 1768-1776, XP002114815 abrege | 8,9,11, 19,20 |
| A | NISHIZAWA M ET AL.: "Electrochemical preparation of ultrathin polypyrrole film at microarray electrodes" JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY; VOL. 95, 1991, pages 9042-9044, XP002114816 le document en entres | |
| A | EP 0 659 794 A (LORRAINE LAMINAGE) 28 Juin 1995 (28.06.95) le document en entres | |
| A | EP 0 038 244 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 21 Octobre 1981 (21.10.81) le document en entres | |
| P,X | BIDAN G ET AL.: "Conducting polymers as a link between biomolecules and microelectronics" SYNTHETIC METALS, vol. 102, 1999, pages 1363-1365, XP002114817 le document en entres | 1,2,19, 20 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document International No

PCT/FR 99/03141

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|--|
| US 5837859 A | 17-11-1998 | FR 2703359 A AT 159028 T DE 69406119 D DE 69406119 T DK 691978 T EP 0691978 A ES 2110228 T WO 9422889 A GR 3025738 T JP 8508311 T | 07-10-1994 15-10-1997 13-11-1997 26-03-1998 25-05-1998 17-01-1996 01-02-1998 13-10-1994 31-03-1998 03-09-1996 |
| EP 0229993 A | 29-07-1987 | CA 1311715 A JP 62181328 A US 4724053 A | 22-12-1992 08-08-1987 09-02-1988 |
| US 5653939 A | 05-08-1997 | US 5846708 A EP 0638173 A JP 7508831 T WO 9322678 A AT 176324 T DE 69228291 D DE 69228291 T EP 0543550 A JP 5322817 A US 5532128 A US 5670322 A US 5891630 A | 08-12-1998 15-02-1995 28-09-1995 11-11-1993 15-02-1999 11-03-1999 02-06-1999 26-05-1993 07-12-1993 02-07-1996 23-09-1997 06-04-1998 |
| EP 0588721 A | 23-03-1994 | FR 2696043 A JP 6188109 A | 25-03-1994 08-07-1994 |
| US 5810989 A | 22-09-1998 | NON | |
| EP 0659794 A | 28-06-1995 | FR 2714077 A AT 177444 T DE 69416971 D DE 69416971 T ES 2131654 T JP 7331491 A US 5522981 A | 23-06-1995 15-03-1999 15-04-1999 07-10-1999 01-08-1999 19-12-1995 04-06-1996 |
| EP 0038244 A | 21-10-1981 | FR 2480314 A | 16-10-1981 |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
 - ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
 - ☐ FADED TEXT OR DRAWING
 - ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
 - ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
 - ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
 - ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
 - ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
-
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
 - ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page blank (uspto)